

## E. 結論

ラットを用いた NIV の 90 日混餌投与試験を実施した結果、NIV は雌雄の造血・リンパ系組織、下垂体を主体とする内分泌系臓器および雌性生殖器等を主体に病変を誘発し、血液学的検査の結果から

no-observed-adverse-effect level (NOAEL) は 6.25 ppm (0.4 mg/kg/day) 未満であると考えられた。

## 参考文献

Ali NS, Yamashita A, Yoshizawa T.: Food additives and contaminants 15: 377-384 (1998)

Bondy GS, Pestka JJ.: J Toxicol Environ Health B Crit Rev 3: 109-143 (2000)

Burnett VL, Short BG, Swenberg JA.: J Histochem Cytochem. 37: 813-818 (1989)

Doebler JA, Martin LJ, Morse JD, Ballough GP, Strauss JA, Anthony A.: Toxicol Lett. 62: 33-38 (1992)

Flynn EA, Yelland KT, Shklar G.: Anat Rec. 206: 23-30 (1983)

Hascheck WM, Voss KA, Beasley VR.: Handbook of Toxicologic Pathology, 2nd edition, Vol. 1, Academic Press, San Diego, CA, pp. 645-700 (2002)

Hinoshita F, Suzuki Y, Yokoyama K, Hara S, Yamada A, Ogura Y, Hashimoto H, Tomura S, Marumo F, Ueno Y.: Nephron 75: 469-478 (1997)

川崎 靖, 内田雄幸, 関田清司, 松本清司, 落合敏秋, 臼井章夫, 中路幸男, 降矢 強, 黒川雄二, 戸部満寿夫: 食衛誌. 31: 144-154 (1990)

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA.: Endocrinology 139: 4252-4563 (1998)

Leininger JR, Riley MG.: Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas, Academic Press, San Diego, CA, pp. 209-226. (1990)

Motwani NM, Caron D, Demyan WF, Chatterjee B, Hunter S, Poulik MD, Roy AK.: J Biol Chem. 259: 3653-3657 (1984)

Neuenschwander SB, Elwell MR.: Pathology of the Fischer Rat: Reference and Atlas, Academic Press, San Diego, CA, pp. 31-42 (1990)

Onodera H, Mitsumori K, Yasuhara K, Shimo T, Kurokawa N, Takahashi M.: Eisei Shikenjo Hokoku 112: 82-88 (1994)

Pang VF, Lambert RJ, Felsburg PJ, Beasley VR, Buck WB, Hascheck WM.: Toxicol Pathol. 15: 308-319 (1987)

Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ.: Toxicol. Lett. 153: 61-73 (2004)

Ridder GM, Von Barga EC, Alden CL, Parker RD.: Fundam Appl Toxicol. 15: 732-743 (1990)

Rocha O, Ansari K, Doohan FM.: Food additives and contaminants 22: 369-378 (2005)

Rogers DF.: Eur Respir J. 7: 1690-1706 (1994)

Ryu JC, Ohtsubo K, Izumiyama N, Nakamura K, Tanaka T, Yamamura H, Ueno Y.: Fundamental and applied toxicology 11: 38-47 (1988)

SCF (Scientific Committee for Food). Opinion on Fusarium toxins. Part 4<sup>1</sup>: Nivalenol. (2000)

SCF (Scientific Committee for Food). Opinion on Fusarium toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol. (2002)

Shapiro LE, Sachchidananda J.: Endocrinology 111: 653-660 (1982)

Sprando RL, Collins TF, Black TN, Olejnik N, Rorie JI, Eppley RM, Ruggles DI.: Food Chem Toxicol. 43: 623-635 (2005)

Sudakin DL.: Toxicology Letters 143: 97-107 (2003)

Taylor MJ, Smart RA, Sharma RP.: Toxicology 56: 179-195 (1989)

Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I.: Food Chem Toxicol. 37: 639-648 (1999)

Ueno Y, Sato N, Ishii K, Sakai K, Tsunoda H.: Applied Microbiology 25: 699-704 (1973)

Yamamura H, Kobayashi T, Ryu JC, Ueno Y, Nakamura K, Izumiyama N, Ohtsubo K.: Food Chem Toxicol. 27: 585-590 (1989)

Yamasaki K, Takeyoshi M, Noda S, Takatsuki M.: Toxicology 176: 101-112 (2002)

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究業績

論文『英文』

Miwa Takahashi, Makoto Shibutani, Yoshiko Sugita-Konishi, Maki Aihara, Kaoru Inoue, Gye-Hyeong Woo, Hitoshi Fujimoto, Masao Hirose; A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats. Food and Chemical Toxicology, submitted.

学会発表  
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小西良子、 窪崎敦隆	実験動物を用いての毒性評価	Mycotoxins	56(2)	105-115	2006
Y.Konishi	The mechanism of the carcinogenic effect of aflatoxins and the occurrence of aflatoxin B1 in nuts in Japan	Mycotoxins	55(2)	129-132	2005
Y.Konishi, S.Kumagai	Toxicity of mycotoxins related with head blight diseases in wheat and establishment of provisional standard for tolerable level of DON in wheat	Mycotoxins	55(2)	49-53	2005
Y.Konishi, T.Tanaka, M.Nakajima, K.Fujita, H.Norizuki, N.Mochizuki, K.Takatori	The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans	Talanta	69	650-655	2006
B.J.Park, K.Takatori, Y.Konishi, I.Kim,M.Lee, D.Han,K.Chung, S.O.Hyun, J.Park	Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure	Surface & Coatings Technology	201	5733-5737	2007

Y.Konishi, B.J.Park, K.Hattori, T.Tanaka, T.Chonan, K.Yoshikawa, S.Kumagai	Effect of Cooking Process on the Deoxynivalenol Content and Its Subsequent Cytotoxicity in Wheat Products	Biosci. Biotechnol. Biochem.	70(7)	1764- 1768	2006
Y.Konishi, M.Nakajima, S.Tabata, E.Ishikuro, T.Tanaka, H.Norizuki, Y.Itoh, K.Aoyama, K.Fujita, S.Kai, S.Kumagai	Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Fumonisin in Retail Foods in Japan	Journal Food Protection	69(6)	1365- 1370	2006
H.Tanaka, M.Takino, Y.Konishi, T.Tanaka	Development of a liquid Chromatography/time -of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs	Rapid Commun. Mass Spectrom.	20	1422- 1428	2006

研究成果の別刷

## 実験動物を用いての毒性評価

小西良子, 窪崎敦隆

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部  
(158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

### 要 旨

食品中に汚染するマイコトキシンは、大量に摂取した場合にあらわれる急性毒性よりも長期暴露による慢性的な健康被害が懸念されている。このような自然毒は食品汚染を完全に防御することが不可能であることから、各国で健康被害が懸念される食品を対象に基準値を設定している。しかし、各国での基準値の違いによる貿易摩擦を防止するために、国際的にもコーデックス規格を設けている。これらの基準値案は、FAO/WHO においての科学者の国際的集まりである JECFA などによって、問題となっているマイコトキシンを対象に毒性評価が行われている。本稿では、いままで JECFA で評価されたマイコトキシンを中心に実験動物を用いた毒性評価を紹介するものである。

キーワード：毒性試験，一日暫定耐容摂取量，基準値

(Received: April 10, 2006)

### はじめに

マイコトキシンのような自然毒は、食品への混入を減らすことはできても完全に防ぐことは不可能である。そのため、これらの毒によって引き起こされる健康被害を明らかにし、「毒性の出現する用量」から「安全な用量」を推定することにより一日暫定耐容摂取量を設定し、それぞれの国の対象食品の消費量を考慮して基準値を設定することが、最も有効な防御策と思われる。

基準値を設定するためには他にも汚染実態の把握、毒性評価、公正なサンプリング方法およびバリデーションされた分析方法、経済的背景などを含む食糧供給への影響、規制を行うための体制の整備とそれに有する経済的負担などがあるが、本稿では毒性評価について述べる。

### 毒性試験

毒性評価は、FAO/WHO 合同食品添加物専門委員会 (JECFA) などで、国際的に整合性の高い方法をもって行われている。健康被害が既にヒト疫学調査で示されている場合は、その結果が優先的に評価されるが、ほとんどの場合は動物を用いた毒性試験の結果をもとに評価される。現在行われている実験動物を用いた主な毒性影響試験は、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、生殖毒性試験、催奇形性試験などがあり、変異原性試験では微生物を用いた方法が使われることも多い。これらの試験は、OECD により確立された方法のように国際的に認められたガイドラインに従って行うことが望ましい。

単回投与毒性試験は、ラットやマウスに被検物質を1回強制的に投与し、投与された動物の50%が死亡する用量(LD<sub>50</sub>)を求めるものである。また、この試験によりどのような毒性が発現し、その標的器官がなんであるかまで把握することができる。

反復投与毒性試験には28日から3ヶ月までの短期毒性試験と、1から2年までの長期毒性試験がある。単回投与毒性試験の結果から得られた結果を参考に、実施する用量を決める。継続的に被検物質を餌等に混ぜて投与し、試験期間中から体重、死亡率、摂取量などを測定し、期間終了後各種生化学検査や、病理組織学的検査をおこなう。

生殖毒性試験は、ラットやウサギが対象となるが、被検物質の交配、着床、器官形成、胎児期、授乳期など生殖過程全般に対する影響を試験するものである。通常離乳した実験動物(F0世代)に被検物質を継続的に投与し、その間に交配、出産をさせる。次の世代の動物(F1世代)にも離乳後から被検物質を継続的に投与し、交配、出産をさせ、F2世代の新生児まで病理組織学影響をみる。

催奇形性試験は、被検物質が先天異常の原因になるかどうかをみる試験法である。妊娠6日から15日の間投与して、21日目に帝王切開し胎児の骨格検査や内臓検査を行う。

遺伝毒性(変異原性試験)は、被検物質がDNAを損傷するか否かを *in vitro* または *in vivo* でみる試験である。*In vitro* 試験ではサルモネラ等を用いて、野外株への復帰変異を検出するAmes試験またはほ乳動物培養細胞の染色体異常を検出する試験が行われる。*In vivo* 試験としては、ほ乳動物の骨髓赤血球中の染色分体断片を検査する小核試験が行われる。

発ガン性試験は、それまでの試験結果で発ガン性を有する可能性が高い被検物質について行われる試験であり、ラットおよびマウス(場合によっては両方)を対象に1.5-2年間反復投与し、発現した腫瘍の頻度や発生個数を投与群と対照群で統計処理することで発ガン性を判定する。化学物質の発ガン性を評価する国際機関としてIARCがあるが、ここでクラス分けされた評価を参考にすることが多い。

その他の毒性としては、免疫毒性(易感染性や抗体産生能低下、遅延型反応等を含む)や体重減少、酵素阻害、タンパク質合成、核酸合成阻害等が挙げられる。

### 一日暫定耐容摂取量の設定

上記で述べた種々の毒性試験結果の中から、通常は慢性毒性試験(長期毒性試験)から、最大無作用量(NOEL)または最大無影響量(NOAEL)を求めることが多い。もしNOEL, NOAELの設定が難しい場合は、最小無影響量(LOAEL)を使用することもある。ここで設定された最大無作用量などに安全率を乗じて、一日暫定耐容摂取量(PMTDI)として用いる。しかし、慢性毒性試験から得られたNOELまたはNOAELよりも、他の毒性試験で得られたNOELまたはNOAELの用量が低かった場合は、その値を参考に算出される。また、その被検物質が蓄積性があるのかないのかも毒性発現には重要な要素となるので、代謝、排泄のデータも加味される。参考までにJECFA<sup>1,7)</sup>で評価された主要なマイコトキシンを対象に、IARC<sup>8,9)</sup>、IPCS<sup>10,11)</sup>、EU-SCF<sup>12)</sup>などが公表している毒性試験結果について簡単にまとめたものを表1-7に記した。これらの表はいままで報告されている毒性試験結果の主要なものピックアップしたものであり、網羅的なものではないことをご承知おきいただきたい。このような毒性試験がマイコトキシンで行われていることを知っていただければと幸いである。

これらの評価からJECFAにおいては、オクラトキシンAのPMTDIは14 ng/kg bw/dayとして

表 1. アフラトキシン

毒性評価	
(1) 排出及び代謝	
排出	経口摂取量の 0.9 % が乳中に 20 % が尿中に排泄.
代謝	(1) AFB <sub>1</sub> は体内で代謝され AFM <sub>1</sub> , AFP <sub>1</sub> , AFQ <sub>1</sub> , AFL に変換され, さらに AFL-M <sub>1</sub> , AFL-H <sub>1</sub> に変換される. (2) 肝臓でチトクロム P450 により AFB <sub>1</sub> -8,9-epoxide を生成.
(2) 急性毒性	
1) LD <sub>50</sub>	0.3 mg/kg bw (AFB <sub>1</sub> : 経口, ウサギ)
2) 標的器官/影響	肝臓
(3) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	25-200 ng (AFB <sub>1</sub> : Ames 試験, サルモネラ)
ii) 標的器官/影響	N/A
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	1 ng/kg bw/day (B 型肝炎ウイルス感染者: 1 年間に 10 万人に 0.3 人)
ii) 標的器官/影響	肝臓/ガン発生
iii) IARC グループ	実験動物: Sufficient evidence (十分な証拠): アフラトキシンの混合物, AFB <sub>1</sub> , AFG <sub>1</sub> Limited evidence (限定的な証拠): AFB <sub>2</sub> Inadequate evidence (不十分な証拠): AFG <sub>2</sub> ヒト: group 1 (人に対して発がん性を示す): アフラトキシンの混合物
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	N/A
ii) 標的器官/影響	N/A
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	0.8 ng/kg bw/day (妊娠中, マウス)
ii) 標的器官/影響	肝臓/脂肪の沈着
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	300 µg/kg bw/day (4 週間, ラット)
ii) 標的器官/影響	細胞性免疫の低下

N/A: not available

表2. オクラトキシン A

毒性評価	
(1) 吸収, 分布, 排出及び代謝	
経口摂取	経口摂取後, 消化管から吸収
分布	経口摂取後 24 時間で脂肪・胃・小腸・肝臓・腎臓・脾臓・心臓・肺・睾丸・筋肉・脳に分布
排出	糞及び尿から排出
代謝	肝臓で水酸化によって (4R)-4-ヒドロキシオクラトキシン A に代謝され, さらにオクラトキシン $\alpha$ に分解される. 摂取量のうち, 6%がオクラトキシン A として, 1-1.5%が (4R)-4-ヒドロキシオクラトキシン A として, 25-27%がオクラトキシン $\alpha$ として尿から排泄.
(2) 急性毒性	
LD <sub>50</sub>	感受性はイヌ・ブタが高く, マウス・ラットは低い 0.2 mg/kg bw (経口: イヌ) 1 mg/kg bw (経口: ブタ) 46-58 mg/kg bw (経口: マウス)
標的器官/影響	出血/繊維素血栓 (腎臓, 脳, 脾臓, 心臓) 壊死 (肝臓, 腎臓)
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	NOEL = 0.008 mg/kg bw/day (経口, 8-12 週齢, ブタ)
標的器官/影響	腎臓/酵素変化
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	(1) 0.4 $\mu$ g/ml (肝臓初代培養細胞, マウス) (2) 290 $\mu$ g/kg bw/2 days (Gavage, 6-12 週間, ラット)
ii) 標的器官/影響	(1) 不定期 DNA 合成 (2) 腎臓, 肝臓/DNA 損傷
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い NOAEL	NOEL = 21 $\mu$ g/kg bw/週 5 回 (2 年, ラット)
ii) 標的器官/影響	腎臓/腺腫・癌腫
iii) IARC グループ	実験動物: 十分な証拠 (sufficient evidence) ヒト: グループ 2B (発ガン性を示す可能性がある)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	1 mg/kg bw/day (妊娠 6 ~ 15 日, ラット)
ii) 標的器官/影響	胎児の成長抑制
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	1.2 mg/kg bw/day (妊娠 8 ~ 11 日, ラット)
ii) 標的器官/影響	胎児出血
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い NOAEL	(1) 0.29 mg/kg bw (経口, 1 回/48 時間, 6 週間, 神経毒性) (2) LOEL = 40 $\mu$ g/kg bw/day (免疫毒性, マウス)
ii) 標的器官/影響	(1) 海馬 (脳)/組織損傷 (2) 胸腺/細胞数の低下

表3. デオキシニバレノール

毒性評価	
(1) 排出及び代謝	
排出	尿または糞より排泄
代謝	体内で脱エポキシ体に代謝される
毒性学上重要な化合物	3-Acetyldeoxynivalenol, 15-Acetyldeoxynivalenol
(2) 急性毒性	
LD <sub>50</sub>	27 mg/kg bw (皮下, 10日齢, アヒル) 46 mg/kg bw (経口, マウス)
標的器官/影響	皮膚/炎症, 拒食・嘔吐
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	NOEL = 0.04 mg/kg bw/day (経口, ブタ)
標的器官/影響	摂食障害, 成長抑制
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	0.06 mg/kg bw/day (経口, 8週間, マウス)
ii) 標的器官/影響	染色体異常
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
iii) IARC グループ	ヒト: group 3 (発ガン性について分類できない)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	NOAEL = 0.375 mg/kg bw/day (経口, マウス)
ii) 標的器官/影響	胎児数の減少, 胎児の成長抑制
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	NOAEL = 0.5 mg/kg bw/day (経口, マウス)
ii) 標的器官/影響	小脳形成不全, 内臓異常, 骨格異常
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	(1) NOEL = 0.1 mg/kg bw/day (マウス) (2) NOAEL = 0.25 mg/kg bw/day (免疫毒性, マウス)
ii) 標的器官/影響	(1) 体重低下 (2) 易感染の上昇

表 4. パツリン

毒性評価	
(1) 分布, 排出及び代謝	
分布	投与7日後でも2-3%が軟組織(脾臓, 腎臓, 肺, 肝臓)又は血液中に留まる.
排出	24時間以内に大部分が糞または尿中に排泄.
(2) 急性毒性	
LD <sub>50</sub>	29-48 mg/kg bw (経口, 雄マウス) 4-5.7 mg/kg bw (腹腔, マウス)
標的器官/影響	振戦
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	0.1 mg/kg bw/day (腹腔, ラット)
標的器官/影響	肝臓・腎臓・小腸/DNA, RNA量の減少
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	20 mg/kg bw/day (経口, ハムスター)
ii) 標的器官/影響	骨髄細胞/染色体異常
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	NOEL = 0.1 mg/kg bw/週3回
ii) 標的器官/影響	N/A
iii) IARC グループ	実験動物: inadequate evidence (不十分な証拠)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	1.5 mg/kg bw/day (経口, ラット)
ii) 標的器官/影響	胎児の体重低下・胚吸収
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	(1) 2 mg/kg bw (免疫毒性) (2) 1.6 mg/kg bw/day (腹腔, ラット) (神経毒性)
ii) 標的器官/影響	(1) 百日咳抗原に対する反応性の低下 (2) アセチルコリンエステラーゼと Na/K ATPase の阻害によるてんかん及び運動障害

表 5. T-2 トキシン

毒性評価	
(1) 排出及び代謝	
排出	T-2 トキシン及びその代謝産物及びグルクロン酸抱合体は糞や尿中に排泄。
代謝	体内で脱アセチル化され、HT-2 トキシン、T-2 テトラオールに代謝。
(2) 急性毒性	
LD <sub>50</sub>	0.06 mg/kg bw (経口, ネコ)
標的器官/影響	体重減少, 摂食障害, 皮膚炎, 下痢, 胃・小腸・骨髄・脾臓・精巣・卵巣での出血および壊死
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い濃度	LOAEL = 0.06 mg/kg bw/day (3 週間, 7 週齢ブタ)
標的器官/影響	白血球数・抗体量の減少, 胸腺・脾臓の縮小
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	(1) 0.1 µg/ml (ハムスター V79 細胞) (a) (2) 0.015 mg/kg bw/day (経口, マウス, 12 週間)
ii) 標的器官/影響	(1) 遺伝子変異 (2) 骨髄細胞/断片化・倍数化
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	慢性毒性試験
ii) 標的器官/影響	肺・肝臓/アデノーマの増加
iii) IARC グループ	実験動物: 限定的な証拠 (limited evidence)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	NOAEL = 0.45 mg/kg bw/day (2nd generation)
ii) 標的器官/影響	胎児の成長抑制
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	LOAEL = 0.23 mg/kg bw/day 0.75 mg/kg bw/day (DNA/RNA 合成阻害) 0.75 mg/kg bw/day (蛋白質合成阻害, 腹腔, マウス) 10 mg/kg bw/day (アポトーシス, マウス) 29 µg/kg bw/day (白血球・赤血球数, ブタ)
ii) 標的器官/影響	肺腺腫, 肝腺腫, 前胃上皮過形成 骨髄, 脾臓, 胸腺 (蛋白質合成阻害)

表 6. フモニシン

毒性評価	
(1) 吸収、排出及び代謝	
経口摂取	経口投与後の吸収はほとんどない。
排出	フモニシンは短時間で排泄される。
(2) 急性毒性	
① LD <sub>50</sub>	致死性の急性毒性を有さない
② 標的器官／影響	N/A
(3) 短期毒性研究	
① 短期毒性に関する最も低い濃度	NOAEL = 1.8 mg/kg bw/day (FB1, マウス) NOAEL = 0.2 mg/kg bw/day (FB1, ラット) NOAEL = 0.2 mg/kg bw/day (FB1, ウマ) NOAEL < 4.5 mg/kg bw/day (FB1, ブタ)
② 標的器官／影響	肝臓, 腎臓, 脳 (白質脳症を発症 (12), ウマ), 肺 (肺水腫を発症 (13), ブタ)
(4) 長期毒性研究	
① 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い濃度	証拠不十分
ii) 標的器官／影響	N/A
② 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	LOEL = 0.67 mg/kg bw/day (腎臓, 雄ラット) LOEL = 0.7 mg/kg bw/day (肝臓, 雌ラット)
ii) 標的器官／影響	雄 F344/N ラットに尿細管腺癌が有為に増加 雌 B6C3F1 ラットに肝臓癌が有為に増加
iii) IARC グループ	実験動物：十分な証拠 (sufficient evidence) ヒト：group2B (人に対して発がん性を示す可能性がある)
③ 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官／影響	N/A
④ 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	10 mg/kg body weight in LMBC mouse (22)
ii) 標的器官／影響	NTD (神経管閉鎖)
⑤ その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	N/A
ii) 標的器官／影響	N/A

表7. ゼアラレノン

毒性評価	
(1) 吸収, 排出及び代謝	
経口摂取	経口摂取後, 80-85 %が吸収される.
排出	摂取後 72 時間以内に胆汁内に移行. 22 %を糞中に排泄.
代謝	$\alpha$ -zearalenol, $\beta$ -zearalenol, $\alpha$ -zearalanol, $\beta$ -zearalanol,
(2) 急性毒性	
LD <sub>50</sub>	2-20 g/kg bw (経口, マウス)
標的器官/影響	膣炎
(3) 短期毒性研究	
短期毒性に関する最も低い NOAEL	NOEL = 40 $\mu$ g/kg bw/day (経口, ブタ) NOEL = 100 $\mu$ g/kg bw/day (経口, ラット)
標的器官/影響	生殖器官
(4) 長期毒性研究	
1) 遺伝毒性	
i) 遺伝毒性に関する最も低い NOAEL	2 mg/kg bw/day (腹腔, マウス) DNA 付加体の形成
ii) 標的器官/影響	肝臓, 腎臓
2) 発癌性	
i) 発癌性に関する最も低い濃度	N/A
ii) 標的器官/影響	N/A
iii) IARC グループ	実験動物: 限定的な証拠 (limited evidence) ヒト: group 3 (発ガン性について分類できない)
3) 生殖毒性	
i) 生殖毒性に関する最も低い濃度	40 $\mu$ g/kg bw/day (経口, ブタ)
ii) 標的器官/影響	子宮重量増加, エストロゲン様効果
4) 催奇形性	
i) 催奇形性に関する最も低い濃度	観察されない
ii) 標的器官/影響	N/A
5) その他の毒性	
i) その他の毒性に関する最も低い濃度	1.5 mg/kg bw/day (経口, マウス) (免疫毒性)
ii) 標的器官/影響	リステリア感染時の増加菌数

いる。因に Health Canada<sup>13)</sup> では 4 ng/kg bw/day, EU では 5 ng/kg bw/day としている。デオキシニバレノールの PMTDI は 1 µg/kg bw/day としており、他の国もほぼ同値である。JECFA ではパツリンは、0.1mg/kg bw/day の用量を週 3 回投与した長期毒性（生殖毒性・発がん性）の結果から NOEL=43 µg/kg bw/day と算出し、その値に安全率 100 を乗じて、PMTDI を 0.4 µg/kg bw/day とした。T-2 トキシンは、ブタでの LOEL=29 µg/kg bw/day をもとにして、安全率 500 を乗じ、PMTDI を 60 ng/kg bw/day と設定した。フモニシンは、ラット雄の短期毒性試験における腎毒性に関する NOEL=0.2 mg/kg bw/day およびラット雄の長期毒性試験における腎腫瘍に関する NOEL=0.67 mg/kg bw/day から、安全率を 100 として、PMTDI を 2 µg/kg bw/day とした。ゼアラレノンの PMTDI は JECFA では 0.5 µg/kg bw/day と設定しているが、EU<sup>14)</sup> では 0.2 µg/kg bw/day としている。

### 今後の課題

アフラトキシンのように遺伝子毒性を呈する発ガン物質の場合にはしきい値がないものと考えられていることから、摂取量を出来るだけ低く抑えるべきであると認識されており PTDI は設定されていない。しかし近年、食糧確保その他、社会的経済的な問題を考慮に入れ、数学的モデルに基づいて「ガンリスクが無視できうる摂取量 (negligible cancer risk intake)」を推定し、基準値設定に用いる試みも始まっている<sup>15)</sup>。

### 参考文献

- 1) JECFA: "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Series 35", pp.363-376 (1996), World Health Organization, Geneva
- 2) JECFA: "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Series 35", pp.377-402 (1996), World Health Organization, Geneva
- 3) JECFA: "Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Series 40", pp.359-468 (1998), World Health Organization, Geneva
- 4) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 44", pp.393-482 (2000), World Health Organization, Geneva
- 5) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 47", pp.419-556 (2001) World Health Organization, Geneva
- 6) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 47", pp.103-280 (2001) World Health Organization, Geneva
- 7) JECFA: "Safety Evaluation of certain food additives and contaminants, Series 47", pp.281-416 (2001) World Health Organization, Geneva
- 8) IARC: "Mycotoxins, Endemic nephropathy and urine publication No.115" (1991)
- 9) IARC: "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol 56" (1993)
- 10) IPCS: "Environmental health criteria 105", pp.27-70 (1990), World Health Organization, Geneva
- 11) IPCS: "Environmental health criteria 219", pp.1-150 (1990), World Health Organization, Geneva
- 12) EU: ([http://europa.eu.int/comm./food/fs/sc/scf/index\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm./food/fs/sc/scf/index_en.pdf)),
- 13) Kuiper-Goodman T: Food Addit. Contam., 13 (suppl), 53-57 (1996)
- 14) EU: Opinion of the scientific committee on food on zearalenon

([http://europa.eu.int/comm./food/fs/sc/scf/out65\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm./food/fs/sc/scf/out65_en.pdf)), 2000

- 15) Health Canada: "Human health risk assessment for priority substances, Canadian environment protection act, Minister of supply and services Canada, Canadian communication group, Ottawa, Ontario, Cat. No En-40-215/41E.36"

### **Toxicological study in experimental animal for hazard identification of mycotoxins**

Yoshiko SUGITA-KONISHI and Atsutaka KUBOSAKI: National Institute of Health Sciences (Setagaya, Tokyo 158-8501 Japan)

As mycotoxins can never be completely removed from commodities, many countries have regulated their levels in food according to their known adverse health effect. For defining the regulation level, an assessment of the health risk is required. To understand the toxic properties of mycotoxins, it is necessary to perform short-term, sub-chronic, and chronic studies at various doses using experimental animals. Also needed are carcinogenic studies in vivo and in vitro using bacteria. From each adequately performed animal study, a threshold dose, such as the NOAEL or NOEL, is defined. The value is essential for the estimation of a provisional tolerable daily intake (PMTDI). I present toxicological data and information of mycotoxins that have been evaluated by JECFA.

**Key words** : mycotoxins, PMTDI, NOEL

## The mechanism of the carcinogenic effect of aflatoxins and the occurrence of aflatoxin B<sub>1</sub> in nuts in Japan

Yoshiko SUGITA-KONISHI

Department of Microbiology, National Institute of Health Sciences  
(1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan)

**Key words :** aflatoxins, carcinogenesis, mechanism, occurrence, peanuts, almond, pistachio

(Received: May 20, 2005)

### Introduction

Aflatoxins (AF) are recognized as the strongest causative agent of liver cancer. AF are a group of closely related compounds with small differences in chemical composition. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) and G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) are frequently found in food. AFB<sub>1</sub> is the most potent and well studied among them. It is generally accepted that dietary exposure to AFB<sub>1</sub> is associated with an increased incidence of hepatocarcinogenesis. In this paper, the mechanism of the carcinogenic effect of AFB<sub>1</sub> is examined based on an evaluation by the International Agency for Research of Cancer (IARC) in 2002<sup>1)</sup>. The occurrence of AFB<sub>1</sub> in nuts in Japan is also investigated.

### The mechanism of carcinogenesis

Aflatoxins (AF) are metabolized in the liver upon ingestion and the metabolites possess carcinogenicity. There has been numerous studies on AFB<sub>1</sub>. AFB<sub>1</sub> is processed through a number of competing pathways. These pathways have been well reviewed and are summarized in Fig. 1. In the primary stage, AFB<sub>1</sub> is converted into 8,9 epoxide or hydroxylated metabolites by cytochrome P 450 enzymes (CYP). Based on experiments in animals, CYP3A4 and CYP1A2 have been identified as major enzymes in the metabolism of AF. CYP3A4 mainly generates exo-8, 9 epoxide and CYP1A2 also generates exo-8, 9 epoxide but mainly endo-8, 9 epoxide and Aflatoxin M<sub>1</sub>.

Most of the exo-8,9 epoxide binds to N7-guanine in DNA or protein and forms DNA-adducts or protein-adducts, leading to genetic changes necessary for malignant transformation and cellular toxicity. However, the remaining exo-8, 9 epoxide and endo-8, 9 epoxide are detoxified via a number of pathways, resulting in glutathion S-transferase conjugates and 8,9-dihydrodiol. Also, the dialdehydes from AFB<sub>1</sub> and AFG<sub>1</sub> form Schiff bases with primary amine groups, such as lysine.

DNA adducts are related to a high frequency of mutations affecting 249<sup>ser</sup> of the p53 tumor suppressor gene (codon 249 G: C to T: A transversion), resulting in an inactivation of p53 function. As a dose-dependent relationship between 249<sup>ser</sup> mutant in the p53 gene and the intake of AFB<sub>1</sub> has been observed, DNA adducts are used as a biological marker to estimate the risk of liver cancer

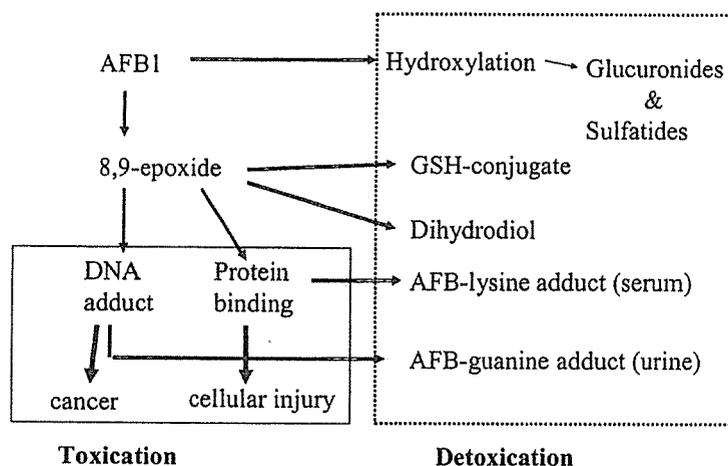


Fig. 1 Metabolites of AFB<sub>1</sub>

caused by AF.

There is synergism between Hepatitis B Virus (HBV) infection and exposure to AF in hepatocarcinogenesis. As part of the background of viral infection, the AFB<sub>1</sub>-DNA adduct could allow the fixation of G: C to T: A at 249<sup>ser</sup> in the p53 gene, leading to an acceleration of the neoplastic process. In areas with a high prevalence of AFB<sub>1</sub> and HBV infection, this synergistic interaction has been observed significantly. This synergy is recognized as an important factor for cancer.

The differences in susceptibility to AF depend on various pathways, being the result of activation of the epoxide and the reaction of the epoxide with proteins and DNA. The pharmacokinetics of AF in humans are still not clear.

Several investigators have studied the carcinogenic potential of AF in vivo using laboratory animals and most of these studies have focused on AFB<sub>1</sub> and hepatocarcinogenesis. Based on such toxicological studies and on epidemiological studies in humans, JECFA estimated the incidence (cancers/year per 100,000 people) of liver cancer resulting from exposure to 1 ng/kg body weight per day of AFB<sub>1</sub>. According to this, no-HBV carrier estimates for AFB<sub>1</sub> alone would have been 0.01 per 100,000 per year on average and the HBV-carrier estimates would have been 0.3 per 100,000 per year. Assuming a population with 1 % carriers of HBV, the estimated population potency for this population is  $0.01 \times 99\% + 0.3 \times 1\% = 0.013$  cancers/year per 100,000 population per ng AFB<sub>1</sub>. If the proportion of HBV carriers is 25 %, this yields an estimated population potency of  $0.01 \times 75\% + 0.3 \times 25\% = 0.083$  cancers/year per 100,000 population per ng AFB<sub>1</sub>. Finally, the estimated population risk for liver cancer depends on the intake of AFB<sub>1</sub>.

Therefore, in order to reduce the potential risk for liver cancer, it is important to prevent exposure to AF. To minimize exposure, a variety of approaches exist, such as control through good agricultural practice (GAP), control through the HACCP program during processing, the setting of maximum limits of AF contamination in commodities and enforcement in international trade.

### Contamination of nuts in Japan

The acceptable level of AFB<sub>1</sub> in commodities is 10 µg/kg in Japan. Table 1 shows the contravention

for AFB<sub>1</sub> contamination in imported commodities in the monitoring systems of quarantine in Japan. Contravention occurred in 32 of 5777 cases in 2003 and 43 of 7978 cases in 2004. The rate of contravention for nuts, spices and pigeon tear was more than 50 %, 22 % and 16 %, respectively, in the last 2 years. These results demonstrate that nuts are the main source of contamination in Japan. Focusing on nuts, 6.9 % (355 of 5117) of samples were contaminated with AFB<sub>1</sub> at 0.2~760 µg/kg and 2.8 % (145 of 5117) of samples has more than 10 µg/kg of AFB<sub>1</sub> in peanuts imported in 1999 ~ 2000<sup>2)</sup>. Itoh et al<sup>3)</sup> reported that among raw shelled peanuts imported into Japan from 1972 to 1991, the concentration of AFB<sub>1</sub> exceeding 10 µg/kg was detected in 0.4 % of samples (24 lots of 5,595). Improvements in the method of sample preparation, which were introduced from 1999, would be one reason why the rate of detection of AFB<sub>1</sub> increased in 1999 ~ 2000 compared with 1972-1991.

The level of contamination in pistachio nuts imported from 2000 to 2003 is shown in Table 2. In 2000 ~ 2001, the percentage of positive cases was more than 40 %, but in 2002~2003, it was less than 8 %. Although in 2000 the rate of contravention was 2.9 %, this fell to 0.6 % after 2002. The maximum level of AFB<sub>1</sub> in 2000 was 643.5 µg/kg but in the last 2 years, the maximum level was 95.3 µg/kg. In the period from 1997 to 1998, the rate of contravention for AFB<sub>1</sub> in pistachio nuts was more than 30 % on inspection at ports<sup>4)</sup>, though 3 % of nuts purchased from local markets were found to contain more than 10 µg/kg of AFB<sub>1</sub><sup>5)</sup>. The ministry of Health, Labour and Welfare in Japan ordered the testing of all lots of pistachio nuts and requested that exporting countries provide good quality nut with less than 10 µg/kg of AFB<sub>1</sub>. Strengthened monitoring for pistachio nuts and the request resulted in a decrease in the rate of contravention after 2002.

The level of contamination in almond nuts imported from 2000 to 2003 is listed in Table 3. The proportion of positive cases was in the range of 12~16 % and that exceeding 10 µg/kg was in the range of 0.05-0.17 %. Though no AFB<sub>1</sub> was detected in 151 samples of almond nuts in 1998, there are some contaminated cases with relatively low levels of AFB<sub>1</sub> in the late years.

With regard to AFB<sub>1</sub> in peanuts, almond nuts and pistachio nuts imported into Japan, relatively

Table 1. Contravention cases for AFB<sub>1</sub> in Japan from 2003 to 2004

year		2003	2004
number of monitoring		5777	7978
number of contravention		32	43
proportion of contravention	nuts	50 %	62 %
	spices	24 %	22 %
	pigeon tear	24 %	16 %

Table 2. Occurrence of AF contamination of almond nuts imported into Japan from 2000 to 2003

year	number of samples	number of positive samples	detection ratio (%)	0.2-10 µg/kg	> 10 µg/kg	contravention ratio (%)
2000	1291	13	1.01	12	1	0.08
2001	1943	16	0.82	16	0	0.00
2002	1694	15	0.89	12	3	0.18
2003	1778	12	0.67	12	1	0.06